

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：15101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23651223

研究課題名(和文) 完全化学合成による最小ウイルス複製システムの創成

研究課題名(英文) Creation of minimal artificial virus replication system by totally chemical synthesis

研究代表者

松浦 和則 (MATSUURA, Kazunori)

鳥取大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60283389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、完全化学合成による比較的短いDNAとペプチドナノカプセル(合成ウイルスキャプシド)からなる「最小限の人工ウイルス」を構築することを目的としている。本研究では、以下の3つの成果が得られた。1) β -AnnulusペプチドとM13 phage DNAとの複合化により、DNAが内包された人工ウイルスの構築に成功した。2) β -AnnulusペプチドをコードしたDNAを設計し、無細胞発現系によるペプチドナノカプセルの合成を試みたが、目的ペプチドの発現は確認できなかった。3) DNA- β -Annulusペプチドコンジュゲートの自己集合により、DNA修飾人工ウイルスを構築することに成功した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this work is construction of minimal artificial virus that consists of synthetic short DNA and peptide nanocapsule (synthetic viral capsid). The important results are as follows : 1) We succeeded in construction of artificial virus that encapsulated M13 phage DNA in the β -annulus peptide nanocapsule. 2) DNA that encoded β -annulus peptide was designed, but the objective peptide could not be obtained by cell-free protein synthesis system. 3) DNA-modified artificial viral capsid was able to be constructed by self-assembly of DNA- β -annulus peptide conjugate.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：ウイルス DNA ペプチド 自己集合 無細胞発現系

1. 研究開始当初の背景

(1) 天然のウイルスは、生物の様々な感染症に関わっている物質であり、ウイルスゲノム核酸 (DNA あるいは RNA) をタンパク質の殻 (キャプシド) が包んだ構造をとっている (さらに、脂質二分子膜のエンベロープを持つものもある)。球状ウイルスのキャプシドは、一義的に決まったタンパク質サブユニットが自己集合して正 20 面体対称性の構造を形成していることから、最近、ナノテクノロジーにおける鋳型材料や、バイオテクノロジーにおける薬物・遺伝子キャリアーとして注目を集めている。

(2) また、天然ウイルスは、宿主細胞に感染し、宿主のシステムを用いて自らのゲノムを複製・タンパク質発現し、ウイルス構造を再構築することで、自らを複製している。もし、このようなウイルスの複製システムが人工系で達成されれば、ウイルスの複製・増殖に関して分子レベルでの理解が深まるだけでなく、ナノテクノロジーやバイオテクノロジーに応用できるウイルスキャプシドを効率的に生産するための新しい方法論をもたらすと期待できる。これまで、生体内で自己複製するウイルスを人工合成した例として、Wimmer らによる約 7,500 塩基長の RNA ゲノムからのポリオウイルスの合成 (*Science* 2002, 297, 1016) と、Venter らによる 5,386 塩基対の DNA ゲノムからの ϕ X174 バクテリオファージの合成 (*PNAS* 2003, 100, 15440) が知られている。しかし、これらはいずれも短い DNA を多数繋ぎ合わせて数千塩基長のゲノム核酸を構築し、それを大腸菌に導入するという煩雑な操作が必要であった。より単純な方法論の人工ウイルス複製システムを開拓できれば、科学的にも工学的にも大変意義深いと思われる。

(3) 一方我々は、トマトブッシースタントウイルス (TBSV) の骨格形成に関わっているとされる β -Annulus 配列の 24 残基ペプチドを化学合成し、それらが水中において単独で自己集合することで、直径約 40nm のペプチドナノカプセル (合成ウイルスキャプシド) を形成することを世界で初めて見出している (*Angew. Chem. Int. Ed.*, 2010, 49, 9662)。

2. 研究の目的

本研究では、この合成ウイルスキャプシドを「自己複製しうる合成ウイルス」に進化させることを目的とする。すなわち、-Annulus 配列の N 末端側に DNA 認識部位を導入したペプチドと、そのペプチド配列をコードした DNA からなる合成ウイルスを構築し、*in vitro* での DNA 複製およびタンパク質発現系により「自己複製しうる最小限の人工ウイ

ルス (minimal artificial virus)」を構築する。このような分子設計に基づく人工ウイルス複製システムは、これまで全く報告がなく、成功すれば世界初の最小の人工ウイルス複製系となる。これにより、ウイルスの複製・増殖に関するモデル系、DDS キャリヤーや人工ワクチン生産のためのナノバイオ材料を効率的に生産する斬新な手法を提供できると期待できる。

3. 研究の方法

(1) -Annulus ペプチドおよびその類縁体は、Fmoc 固相合成法により合成し、逆相 HPLC により精製、MALDI-TOF-MS および MS/MS 解析により同定した。ペプチドナノカプセル内部への DNA の内包は、ペプチドと DNA の電荷比が 1:1 となるように混合し、動的光散乱 (DLS) 測定および TEM 観察 (シスプラチンおよび酢酸ウラニル染色) により評価した。

(2) T7RNA ポリポリメラーゼのプロモーター配列、SD 配列、開始コドン、各アミノ酸に対応するコドン、終止コドンおよび PCR 用のプライマー配列を含む 120base の DNA を設計・合成した。これを PCR により増幅し、ゲル電気泳動により確認した。この最小ウイルスのための人工遺伝子を、無細胞発現系 PURE SYSTEM による発現を行い、SDS-PAGE による確認を行った。

(3) C 末端側に Cys を導入した -Annulus ペプチドを Fmoc 固相合成法により合成し、逆相 HPLC により精製、MALDI-TOF-MS により同定した。一方、5' 末端アミノ化 DNA (dA20) に Sulfo-GMBS を介してマレイミド基を導入し、Cys 導入 -Annulus ペプチドとのカップリングを行った。得られたコンジュゲート分子の自己集合挙動を、DLS 測定および TEM 観察などから評価した。

4. 研究成果

(1) 以前の研究で、-Annulus ペプチドの自己集合により形成したナノカプセルの内部は、中性 pH において、カチオン性であることが示唆されている。そこで、M13 ファージ DNA (7249 塩基) のペプチドナノカプセルへの内包を検討した。未集合の -Annulus ペプチドに対して DNA を電荷比 1:1 となるように加えたところ、平均粒径 82 nm の集合体が形成することが DLS 測定からわかった。これをシスプラチン染色 (DNA のみを染色) により TEM 観察すると、20-45 nm の球状構造が観察され、これを酢酸ウラニル染色して TEM 観察するとコア-シェルのコントラストを有する 75-120 nm の球状構造体が観察された。これは、ペプチド集合体内部に DNA が凝縮・内包されていることを示唆している。

(2) T7RNA ポリポリメラーゼのプロモーター配列、SD 配列、開始コドン、各アミノ酸に対応するコドン、終止コドンおよび PCR 用のプライマー配列を含む 120base の DNA を設計・合成した。これを PCR 反応により増幅し、ゲル電気泳動により確認した。これを用いて、PURE SYSTEM による無細胞発現を数回試みたが、目的ペプチドの発現は確認されなかった。DNA 自体の二次構造形成などが原因として考えられる。また、PURE SYSTEM よりも発現効率の高い大腸菌抽出物などを用いた発現の検討が必要である。

(3) DNA を表面修飾した合成ウイルスキャプシドの構築とその特性解析を実施した。5' 末端アミノ化 DNA (dA20) に Sulfo-GMBS を介してマレイミド基を導入し、Cys 導入 -Annulus ペプチドとのカップリングを行った。この dA20-Annulus ペプチドコンジュゲートは、カプセル表面上の DNA 間の静電反発にも関わらず、0.025 mM という比較的低濃度であっても、水中で約 70 nm の球状構造体を形成することがわかった(図1)。この合成ウイルスキャプシド表面に提示された dA20 は、相補的 DNA である dT20 や poly dT と部分的にハイブリダイゼーションすることが、二重鎖特異的蛍光色素 DAPI の結合実験から明らかとなった。また、dA20 被覆合成ウイルスキャプシドの電位がマイナスの値を示したことから、DNA が表面に被覆されていることが示された。さらに、dA20 被覆合成ウイルスキャプシドに相補的な poly dT を添加すると球状構造がさらに集積した葡萄状の構造体が TEM にて観察された(図1)のに対し、非相補的な poly dA を添加した場合には、孤立した球状構造体が観察された。つまり、DNA の相補的ハイブリダイゼーションにより、合成ウイルスの組織化に成功したと言える。

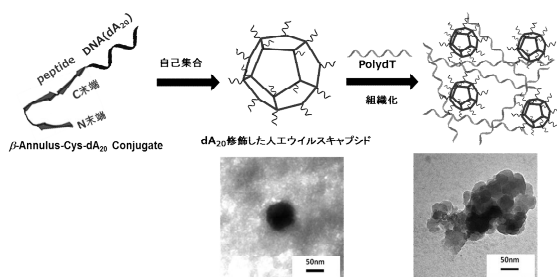


図1. DNA(dA20)被覆合成ウイルスキャプシドの自己集合と poly dT による組織化の模式図および TEM 像。

(4) 本研究では、当初、-Annulus 配列をコードした DNA を内包した最小合成ウイルスを創製することを目的としていたが、DNA の無細胞発現には成功しなかった。しかし、合成ウイルスキャプシドへの M13 phage DNA の内包や、キャプシド表面へのオリゴ DNA の提示には成功した。これらの成果は、合成ウイルスキャプシドを遺伝子デリバリー材料

や、ナノテクノロジー材料へと応用する際の有用な指針となると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

K. Matsuura, "Rational Design of Self-Assembled Proteins and Peptides for Nano- and Micro-sized Architectures", *RSC Advances*, 査読有, **4**, 2942-2953(2014)

DOI: 10.1039/C3RA45944F

松浦和則, 「ペプチド化学でウイルス構造をつくる! 自己集合するナノカプセルの応用に向けて」, *化学*, 査読無, **68**, 19-23(2013)

K. Matsuura, K. Watanabe, Y. Matsushita and N. Kimizuka, "Guest-Binding Behavior of Peptide Nanocapsules Self-assembled from Viral Peptide Fragments", *Polymer J.*, 査読有, **45**, 529-534 (2013)

松浦和則, 「ウイルスに学んだペプチド自己組織化材料」, *機能材料*, 査読無, **33**, 52-56 (2013)

松浦和則, 「ウイルス構造に学んだペプチドナノ材料の創製」, *化学工業*, 査読無, **63**, 409-414 (2012)

K. Matsuura, "Construction of spherical virus-inspired peptide nanoassemblies", *Polymer J.*, 査読有, **44**, 469-474 (2012)

[学会発表](計12件)

松浦和則, 本荘貴英, 山田沙紀, 「タンパク質および DNA で着せ替えた人工ウイルスキャプシドの創製」, 第7回バイオ関連化学シンポジウム, 2013年9月28日, 名古屋大学

松浦和則, 本荘貴英, 山田沙紀, 西川晶子, 「着せ替えウイルスキャプシドの創製」, 第62回高分子討論会, 2013年9月11日, 金沢大学

松浦和則, 「ウイルスの自己集合に学んだペプチドナノ材料の構築」, 日本化学会第93春季年会, 2013年3月23日, 立命館大学

K. Matsuura, "Synthetic Capsids Self-assembled from Viral Peptide Fragments", The Second Asian Chemical Biology Conference, 2012年7月5日, Southern Beach Hotel & Resort Okinawa
K. Matsuura 他3名, "Peptide Nanocapsule Self-assembled from Viral -Annulus Peptide", The 3rd Asian Symposium on Advanced Materials, 2011年9月22日, 九州大学

松浦和則, 「ウイルス由来ペプチドの自己集合によるナノカプセルの創製」, 第27回日本 DDS 学会学術集会, 2011年6月9

日，東京大学
松下祐大，松浦和則，君塚信夫，「蛍光
ラベル beta-Annulus ペプチドの合成と
自己集合挙動」，第 60 回高分子学会年次
大会，2011 年 5 月 25 日，大阪国際会議
場

〔その他〕

研究内容が、科研費 NEWS ， 1, 9(2013) にて
紹介された。

6．研究組織

(1)研究代表者

松浦 和則 (MATSUURA, Kazunori)

鳥取大学・工学研究科・教授

研究者番号：60283389